

Lit. 327200/DE - Nichtpubl.
Cholestech Corp.

Roche Diagnostics GmbH

AZ: 3Ni 40/00

UZ: C34131Ni

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschri
⑪ DE 3029579 A1

Δ US 4,477,575

- ⑳ Aktenzeichen:
㉑ Anmeldetag:
㉒ Offenlegungstag:

P 30 29 579.5-41

5. 8. 80

18. 2. 82

Δ EP 0045 476

A61 K39/14

G 01 N 33/52

㉓ Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

㉔ Erfinder:

Vogel, Peter, Dr.rer.nat.; Braun, Hans-Peter, Dr.rer.nat.,
6944 Hemsbach, DE; Berger, Dieter, Dr.rer.nat., 6806
Viernheim, DE; Werner, Wolfgang, Dr.rer.nat., 6800
Mannheim, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉕ Mittel zur Abtrennung von Plasma oder Serum aus Vollblut

DE 3029579 A1

E 3029579 A1

130067/0393

3029579

- 17 -

A n s p r ü c h e

1. Mittel zur Abtrennung von Plasma oder Serum aus Vollblut, bestehend aus einer Schicht aus Glasfasern mit einem Durchmesser von 0,2 - 2,5 μ , vorzugsweise 0,5 - 1,5 μ , wobei das Volumen des abzutrennenden Plasmas oder Serums höchstens 50 %, vorzugsweise weniger als 30 % vom Saugvolumen der Glasfaserschicht beträgt.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß den Glasfasern synthetische organische Fasern beige-mischt oder diese durch anorganische oder organische Bindemittel verfestigt bzw. miteinander verklebt sind.
3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfasern in einer Säule geschichtet sind und am Kopf der Säule die Aufgabe für das Blut und am Ende die Abnahme für das Plasma vorgesehen ist.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß unterhalb der Glasfaserschicht ein Ventil und darunter ein Zwischenspeicher für das Plasma vorgesehen ist, aus dem das Plasma durch Komprimieren ausgetrieben werden kann.
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserschicht aus einem Glasfaserpapier oder Glasfaservlies besteht und Teil eines diagnostischen Mittels für den Nachweis von Inhaltsstoffen des Plasmas ist.
6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserschicht die oberste Schicht eines mehr-

130067/0393

05 00 00

3029579

- 18 -

schichtigen diagnostischen Mittels ist, welches auf einem inerten Träger befestigt ist.

7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreaktion in der untersten Schicht abläuft und durch den Träger analysiert wird.
8. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Glasfaserschicht und gegebenenfalls weitere Schichten über eine ablösbare Schicht mit der Reaktionsschicht verbunden sind und nach dem Durchtreten des Plasmas bzw. nach Ablauf der Reaktion mit der ablösbaren Schicht zusammen entfernt werden.
9. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die ablösbare Schicht ein Netzwerk ist, welches neben der Reaktionsschicht mit dem Träger verbunden ist.
10. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsschicht auf einem Teilbereich der Glasfaserschicht in saugfähigem Kontakt aufgeklebt oder aufgedruckt ist und das Blut auf den anderen Teilbereich aufgebracht wird.
11. Verfahren zum Abtrennen von Plasma oder Serum aus Vollblut, dadurch gekennzeichnet, daß man das Blut langsam durch eine Schicht aus Glasfasern mit einem Durchmesser von $0,2 - 2,5 \mu$ sickern läßt und das ablaufende Plasma gewinnt, wobei das Volumen des abzutrennenden Plasmas oder Serums höchsten 50 %, vorzugsweise weniger als 30 % vom Saugvolumen der Glasfaserschicht beträgt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man das ablaufende Plasma direkt in ein diagnostisches

130067/0393

03.08.80

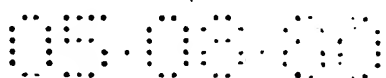
3029579

- 19 -

Mittel einbringt.

13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man das ablaufende Plasma in einem saugfähigen Träger auffängt und trocknet und zum Nachweis der Inhaltsstoffe eluiert.

130067/0393



3029579

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

2382

Mittel zur Abtrennung von Plasma oder Serum aus Vollblut

In der Klinischen Chemie ist die Abtrennung von Serum oder Plasma aus Blut von überragender Bedeutung, da praktisch nur aus diesen beiden die Analyse von gelösten Blutbestandteilen störungsfrei durchgeführt werden kann.

Die normale und gebräuchlichste Form der Abtrennung von Serum oder Plasma von den Erythrozyten ist die Zentrifugation. Diese ist jedoch insbesondere bei der Verwendung kleiner Probenmengen problematisch, auch ist die Trennung von Überstand und Blutkuchen nicht immer einfach, so daß hierfür eine ganze Reihe von Hilfsmitteln in der Literatur zu finden sind, z.B. DE-AS 25 59 242.

Von besonderer Problematik ist die Verwendung von Vollblut bei Schnell Diagnostica. Schnell Diagnostica sind reagentienhaltige saugfähige oder quellbare Träger, vorzugsweise aus Filterpapier, auf die eine geringe Menge, z.B. ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit aufgebracht wird und bei denen aufgrund der überwiegend sehr kurzen Reaktion eine Farbänderung eintritt, die entweder visuell bewertet wird oder remissionsphotometrisch ausgemessen wird. Da trübe und gefärbte Lösungen wie Blut die Ablesung stören, hat es daher nicht an Versuchen gefehlt, Schnell Diagnostica für die direkte Verwendung von Vollblut zugänglich zu machen. Hierbei sind z.B. zu nennen das Überziehen von Testpapieren mit semipermeablen Membranen (US-P 3 092 465) und die Ver-

130067/0393

05 03 00

3029579

- 2 -

wendung von wasserquellbaren Filmen, in die nur die gelösten Bestandteile des Blutes, nicht aber die Erythrozyten eindringen können (DE-AS 15 98 153). Diese beiden Verfahren sind an sich brauchbar, allerdings nur bei Testen für niedermolekulare Bestandteile des Blutes, wie z.B. Glucose oder Harnstoff; höhermolekulare Bestandteile des Blutes, wie z.B. Lipide oder die an Serum-Protein gebundenen Substrate wie z.B. Bilirubin, können auf diese Weise nicht bestimmt werden, weil sie nicht in der Lage sind, in den Film einzudringen bzw. durch die semipermeable Membran hindurchzugelangen. Weiterhin sind Vorschläge bekannt geworden, diagnostische Mittel zum Abtrennen der Blutzellen mit Membranfiltern zu bedecken (DE-AS 22 22 951 und DE-OS 29 22 958). Der Nachteil dieser diagnostischen Mittel ist, daß durch Membranfilter das Blut nur sehr langsam und in geringer Menge durchdringen kann, weil sie leicht verstopfen und die Reaktion entsprechend lange dauert. Im Gegensatz zu den vorher genannten diagnostischen Mitteln, die bereits im Handel sind, sind "Schnellteste" der zuletzt geschilderten Art deshalb noch nicht im Handel erschienen.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein einfaches Mittel zum Abtrennen von Plasma oder Serum aus Vollblut zu finden, daß ohne Zentrifugieren rasch und sicher kleine Mengen Blut trennt und insbesondere als Probenvorbereitung für diagnostische Zwecke geeignet ist.

Es wurde nun gefunden, daß die Abtrennung von Plasma bzw. Serum aus Vollblut schnell und einfach und in genügender Menge erfolgt, wenn man das Blut durch eine Schüttung aus Glasfasern allein oder in Mischung mit anderen Fasern strömen läßt. Diese Tatsache muß umsomehr als überraschend an-

130067/0393

05.08.80

3029579

- 3 -

gesehen werden, als in der oben erwähnten DE-AS 22 22 951 die Verwendung von Glasfasermatten zur Abtrennung von weißen Blutzellen schon beschrieben ist, jedoch für die Abtrennung der Erythrozyten die zusätzliche Verwendung von Membranfiltern als unbedingt notwendig gefordert wird.

Die Erfindung ist in den Ansprüchen näher gekennzeichnet.

Die Glasfasern können lose gestapelt, sowie in Form von Papieren, Vliesen oder Filzen, aber auch gehalten durch eine äußere Form in jeder gewünschten Gestalt Verwendung finden.

Die so gestalteten Glasfasern können als Abdeckung für eines der oben beschriebenen Schnelldiagnostica dazu dienen, daß dieses diagnostische Mittel, für dessen Verwendung bisher die vorherige Gewinnung von Serum oder Plasma notwendig war, jetzt für die direkte Verwendung von Vollblut geeignet ist.

Weiterhin können mit Glasfasern gefüllte Säulen, Filternutschen oder andere geeignete Gefäße auch dazu verwendet werden, durch einfaches Durchlaufen von Blut Serum oder Plasma ohne Zentrifugation zu gewinnen und diese in geeigneter Weise für diagnostische Mittel bereitzustellen, da das Serum bzw. Plasma schneller durch eine solche Schicht durchläuft, als die Erythrozyten und Leucozyten.

Die oben genannten Glasfasern können aus Fasern unterschiedlichen Durchmessers bestehen. Das Glasmaterial kann aus alkalihaltigem oder alkalifreiem Borosilikatglas, aber auch aus reinem Quarzglas bestehen. Fasermaterial aus anderen

130067/0393

technischen Gläsern, z.B. borfreien Alkaligläsern, Kristallglas, Bleiglas u.a. befinden sich in den notwendigen Abmessungen der Fasern nicht im Handel und konnten daher nicht unter sucht werden. Es wird aber davon ausgegangen, daß auch sie geeignet sind. Der Durchmesser der Glasfasern kann zwischen 0,2 μ bis etwa 2,5 μ , vorzugsweise aber zwischen 0,5 μ und 1,5 μ , liegen. Ihre Länge ist nur durch die Art der Stapelung begrenzt, hat aber ansonsten keinen Einfluß.

Weiterhin können die Glasfasern untereinander, aber auch mit Fasern aus anderen Materialien, vermischt werden, wodurch der innere Zusammenhalt der Fasern verbessert werden kann. Geeignet sind z.B. synthetische Fasern wie Polyester, Polyamid u.a., aber auch Fasern aus Polyethylen, Polypropylen und anderen nachträglich durch Wärme verformbaren Kunststoffen.

Weiterhin können die Glasfasern durch Zusatz von anorganischen Bindemitteln (z.B. Wasserglas) oder organischen Bindemittel (z.B. Polyvinylacetat, Polyvinylpropionat, Polyacrylsäureester u.a.) verfestigt werden, durch die die Glasfasern an den Berührungsstellen verklebt werden.

Besonders bevorzugt ist die Kombination der erfindungsgemäßen Glasfaserschichten mit diagnostischen Mitteln, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Den Aufbau eines solchen erfindungsgemäßen diagnostischen Mittels erläutert Fig. 1. Auf einer steifen Grundfolie 2 ist die Reaktionsschicht 1 des Schnelldiagnosticums aufgeklebt. Dicht über der Reaktionsschicht ist eine dünne, für Flüssig-

keiten durchlässige formstabile Trennschicht 4 aufgebracht, die aus einem Netzwerk aus gewebten oder verfilzten Kunststoff-Fäden besteht und die auf beiden Seiten der Reaktionsschicht in leicht lösbarer Weise auf die Grundfolie in der Art geklebt ist, daß ein leicht zu fassendes Ende 4a am längeren Teil der Grundfolie freibleibt. Oberhalb der Reaktionsschicht ist nun das Glasfaserpapier 3 aufgebracht. Dieses wird durch ein weiteres Netzwerk 5 in seiner Lage fixiert, das wie das Netzwerk 4 oberhalb und unterhalb der Reaktionsschicht angeklebt ist.

Die Reaktionsschicht 1 kann aus einem imprägnierten saugfähigen Träger oder quellbarem oder porösem Kunststofffilm bestehen. Als Unterlage 2 dient vorzugsweise eine dickere Kunststoffolie, ein fester Karton, eine Glasplatte oder ein anderes stabiles Trägermaterial.

Nach Aufbringen eines Blutropfens 8 auf die obere Seite des Schnelldiagnosticums wird im Glasfaserpapier das Plasma von den Erythrozyten und Leucozyten abgetrennt. Das auf diese Weise abgetrennte Plasma gelangt über die Trennschicht 4 in die Reaktionszone 1 des diagnostischen Mittels. Nach einer angemessenen Zeit, in der das Plasma in die Reaktionszone eingedrungen ist, wird die Trennschicht an ihrem freien Ende ergriffen und mit dem Glasfaserpapier und der Halteschicht abgetrennt. Anschließend kann die Reaktionsschicht, in der nun die Nachweisreaktion stattfindet, visuell oder remissionsphotometrisch ausgewertet werden.

Einen weiteren möglichen Aufbau des erfindungsgemäßen Schnelldiagnosticums verdeutlicht Fig. 2, wobei zusätzlich zu dem oben beschriebenen Aufbau eine oder mehrere für

Flüssigkeiten aller Art durchlässige Schichten 6 in der Art aufgebracht sind, daß sie entweder oberhalb (Fig. 2a) oder unterhalb (Fig. 2b) der Glasfaserpapiere zu liegen kommen. Diese zusätzlichen Schichten können mit Reagenzien imprägniert sein, die entweder leicht löslich sind und zusammen mit dem Plasma in die Reaktionszone gelangen oder aber weniger löslich sind und eine oder mehrere Vorstufen der Nachweisreaktion bereits außerhalb der endgültigen Reaktionszone 1 ablaufen lassen.

In Fig. 3 wird ein anderer Aufbau (Fig. 3a Seitenansicht, Fig. 3b Aufsicht) des erfindungsgemäßen Schnelldiagnostikums beschrieben, bei dem das Glasfaserpapier 3 direkt auf die Grundfolie 2 aufgeklebt ist. Auf einen Teil des Glasfaserpapiers ist die Reaktionsschicht 7 aufgebracht. Auf den freibleibenden Teil des Glasfaserpapiers wird das Blut 8 aufgetragen. Das sich im Glasfaserpapier von den Erythrozyten abtrennende Plasma diffundiert im Glasfaserpapier zu der Reaktionsschicht und in diese hinein. Die bei der Reaktion entstehenden Reaktionsfarben können von der Oberseite des Schnelldiagnostikums beobachtet und ausgewertet werden. Die Reaktionsschicht kann direkt durch Bedrucken oder Beschichten auf die Glasfasermatte aufgebracht werden. Sie kann aber auch in Form eines ganz- oder teilimprägnierten saugfähigen Trägers auf das Glasfaserpapier aufgeklebt werden.

Weiterhin kann, wie in Fig. 4 und Fig. 5 beschrieben, das erfindungsgemäße diagnostische Mittel so aufgebaut sein, daß auf der Grundfolie 2 zuerst ein saugfähiges Material 9 wie z.B. Cellulosepapier oder ein Kunststoffvlies und oberhalb dieses Materials das Glasfaserpapier 3 und die Reaktionsschicht 7 aufgeklebt sind. Dabei kann das saug-

fähige Material 9 die gleiche Fläche wie die Reaktionsschicht einnehmen (Fig. 5) oder aber eine größere Fläche, so daß das Material 9 eine Fläche freiläßt (Fig. 4). Das Blut wird auf die freibleibende Fläche des saugfähigen Materials (Fig. 4) oder direkt neben das saugfähige Material (Fig. 5) aufgetropft und von diesem schnell aufgenommen und unter das Glasfaserpapier gesaugt. Anschließend wird durch die Saugfähigkeit des Glasfaserpapiers Blut durch das Glasfaserpapier nach oben gesaugt, wobei die Abtrennung der Erythrozyten erfolgt und Plasma in die Indikatorzone gelangt. Die Reaktion wird wie in Fig. 3 von der Oberseite des Schnellldiagnosticums beobachtet.

Fig. 6 zeigt einen weiteren Aufbau eines für die direkte Verwendung von Vollblut geeigneten Schnellldiagnosticums. Dieses ist so aufgebaut, daß auf der steifen Grundfolie 2 nebeneinander eine saugfähige Schicht 9, die z.B. aus einem Cellulosepapier oder aus einem cellulosehaltigen Kunstfaservlies besteht und eine Glasfaserschicht 3 aufgebracht sind. Die beiden Schichten sollen einen engen Kontakt aufweisen. Auf der Oberfläche der saugfähigen Schicht 9 befinden sich die für das Schnellldiagnosticum notwendigen Nachweisreagenzien, die z.B. durch Beschichten mit einem offenen Film gemäß DE-OS 29 10 134 aufgebracht sein können. Beim Auftragen des Bluttröpfens auf die von der Reaktionszone entferntere Seite der Glasfaserschicht findet die Trennung Plasma-Erythrozyten so statt, daß zuerst das Plasma mit seiner Front an der Trennstelle zu der saugfähigen Schicht 9 anlangt und sofort von dieser aufgesaugt wird. Durch Kapillarkräfte gelangt dann das Plasma in den eigentlichen Testbezirk, wo sich die Nachweisreaktion z.B. durch eine von oben sichtbare Farbveränderung bemerkbar macht.

Weiterhin kann das erfindungsgemäße diagnostische Mittel in der in Fig. 7 beschriebenen Form hergestellt werden. Dabei wird das Glasfaserpapier 3 auf eine Grundfolie 2 aufgeklebt. Die Grundfolie hat an der Behrührungsstelle ein oder mehrere Löcher 11. Auf der anderen Seite ist eine Reaktionsschicht 7 direkt oder durch Kleben auf das Glasfaserpapier aufgebracht. Das Blut 8 wird so auf das diagnostische Mittel aufgebracht, daß es durch das Loch (oder die Löcher) auf das Glasfaserpapier 3 gelangen kann. Das im Glasfaserpapier abgetrennte Plasma trifft nun auf die Reaktionsschicht 7 und führt zu der Reaktion, die visuell oder remissionsphotometrisch an deren Oberfläche ausgewertet werden kann.

Die Reaktionsschicht 7 kann sowohl aus einer, z.B. auf die Glasfasermatte aufgedruckten Schicht bestehen, sie kann aber auch aus einem mehrschichtigen Element bestehen, bei dem die Schichten verschiedene Reagenzien enthalten können und/oder mehrere Funktionen erfüllen können, wie z.B. in der DE-OS 29 22 958 beschrieben.

Fig. 8a zeigt in der Seitenansicht und Fig. 8b zeigt in der Aufsicht einen weiteren Aufbau eines solchen erfindungsgemäßen diagnostischen Mittels, bei dem die aus Glasfasern bestehende Trennschicht 3 sowie eine oder mehrere für die Reaktion notwendigen Schichten 12 durch eine vorgefertigte Form 18 zusammengehalten werden. Das Blut wird hierbei auf die Seite des Glasfaserfilters aufgetropft. Das abgetrennte

05.08.80

3029579

- 9 -

Plasma gelangt anschließend in die Reaktionsschicht(en), wobei die Indikatorreaktion auf der dem Glasfaserfilter gegenüberliegenden Seite visuell oder remissionsphotometrisch ausgewertet wird.

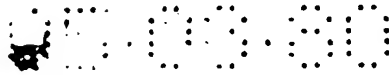
Aus zeichentechnischen Gründen sind in einigen Figuren die verschiedenen Schichten teilweise mit einem Zwischenraum gezeichnet. In der praktischen Ausführung liegen die Schichten aufeinander, so daß Flüssigkeiten ungehindert übertreten können. Weiterhin sind die Reaktionsschichten 1 und 12 querunterteilt, um anzudeuten, daß sie auch aus mehreren übereinanderliegenden Schichten bestehen können.

130067/0393

Desweiteren beschreibt Fig. 9 den Aufbau einer erfindungsgemäßen Form, die Plasma von den Erythrozyten des Vollblutes ohne Zentrifugieren abtrennt und für diagnostische Zwecke bereitstellt. Dazu wird ein Rohr oder ein Gefäß, das z.B. die beschriebene Form 13 hat, mit den oben beschriebenen Glasfasern 14 gefüllt. Das Blut 8 wird oben in das Gefäß eingefüllt. Auf dem Weg nach unten wird nun durch die Glasfasern das Plasma von den Erythrozyten des Blutes abgetrennt. Das sich im unteren Teil des Gefäßes sammelnde Plasma kann nun z.B. durch eine "end-to-end"-Kapillare aufgenommen oder abgesaugt werden und direkt einem anderen diagnostischen Verfahren zugeführt werden.

Einen anderen erfindungsgemäßen Aufbau beschreibt die Fig. 10, wobei das zur Abtrennung der Erythrozyten geeignete Gefäß 13 die Form einer Kolbenspritze aufweisen kann, die im unteren Teil mit Glasfasern 14 dicht gefüllt ist. Das Blut⁸ wird in das oben offene Gefäß eingebracht. Nach erfolgter Trennung von Erythrozyten und Plasma, wobei das Plasma sich im unteren Gefäßteil sammelt, kann durch Einführen und vorsichtiges Drücken des Kolbens 17 zuerst das Plasma aus dem Spritzenkörper herausgedrückt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Plasma-Gewinnung kann, wie in Fig. 11 beschrieben, auch mit einem Gefäß 15 durchgeführt werden, das durch ein in einer Richtung durchlässiges Ventil in zwei Teile getrennt ist und mit den oben beschriebenen Glasfasern gefüllt ist. Das Blut 8 wird oben in das Gefäß eingefüllt. Das Plasma sammelt sich nach der Abtrennung von den Erythrozyten im unteren Teil des Gefäßes und kann nun durch Zusammenpressen des unteren Gefäßteiles entleert werden. Dabei verhindert das Ventil 16, daß das



3029579

- 11 -

Plasma in den oberen, die Blutzellen enthaltenden Teil zurückströmt.

Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren mit einer Anordnung durchgeführt werden, die durch Fig. 1 beschrieben wird, wobei die auf die Trägerfolie 2 geklebte Schicht 1 aus einem definiert saugenden Material besteht, so daß beim Auftragen von Blut ein definiertes Plasmavolumen in die Schicht 1 gelangt. Nach dem Abtrennen der Schichten 3, 4 und 5 kann das Plasma, d.h. die zu analysierende Substanz durch ein Lösungsmittel eluiert werden. Die Elution des Plasmas und die Analyse kann sofort, aber auch - je nach zu analysierender Substanz - zu einem späteren Zeitpunkt an anderem Ort durchgeführt werden. Falls die Analyse erst später durchgeführt werden soll, kann es vorteilhaft sein, das Plasma zunächst, beispielsweise mit warmer Luft oder durch Gefrier-trocknen, einzutrocknen. Es ist weiterhin möglich, getrennt von dem Bezirk für das Aufbringen der Probe, einen oder mehrere Bereiche vorzusehen, die Reagenzien enthalten, so daß beim Eluieren mit einem Lösungsmittel das ganze Reaktionsgemisch gleichzeitig eluiert wird.

In den folgenden Beispielen soll die Erfindung näher erläutert werden:

130067/0393

05.08.80

3029579

- 12 -

Beispiel 1Cholesterin-Teststreifen

0,117 g Methylhydroxypropylcellulose
(Culminal MHPC 8000)
7,000 g Titandioxid
0,138 g KH_2PO_4
0,479 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
3400 U Cholesterinesterase
5000 U Cholesterinoxidase
 $7 \cdot 10^4$ U Peroxidase
0,476 g Nat-riumdioctylsulfosuccinat

werden in 700 ml Wasser gelöst. Dann werden nacheinander

14,0 g Cellulose
4,2 g Polyvinylpropionat-Dispersion

homogen eingearbeitet. Zuletzt wird

0,33 g Tetramethylbenzidin gelöst in
1,6 ml Aceton

zugegeben. Dieser Ansatz wird etwa 300 μ dick auf eine glatte Kunststoffolie beschichtet und nach dem Trocknen bei 60° C - 70° C in 6 mm breite Streifen geschnitten. Diese Streifen werden anschließend zusammen mit einem 60 μ starken Netzwerk aus Nylon und einem ebenfalls in 6 mm breite Streifen geschnittenen Glasfaserpapier (Glasfaserfilter Nr. 3362 von Schleicher & Schüll) auf eine Polyesterfolie geklebt. Anschließend wird sie in 6 mm breite Streifen zerschnitten.

130067/0393

05 08 80

3029579

- 13 -

Betüpfelt man die Oberseite des Teststreifens mit 40 μ l Blut und entfernt nach 1 Minute das Glasfaserpapier mit dem restlichen Blut zusammen mit dem Netzwerk durch Abreißen, dann bildet sich innerhalb von 3 Minuten auf dem Testbezirk eine Reaktionsfarbe, die derjenigen entspricht, die man erhält, wenn anstelle des Blutes mit dem abzentrifugierten Plasma des gleichen Blutes getüpfelt wird.

Beispiel 2

Cholesterin-Test

0,45	g	KH_2PO_4
1,55	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
$1,5 \times 10^4$	U	Cholesterinesterase
1×10^4	U	Cholesterinoxidase
3×10^5	U	Peroxidase
2,0	g	Na-Dioctylsulfosuccinat
6,9	g	Natrium Alginat (Algipon)

werden in 250 ml Wasser gelöst, dann werden noch

2,0	g	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
-----	---	-------------------------------

gelöst in 15 ml Aceton dazugegeben. Anschließend werden noch

20,0	g	Kieselgur
------	---	-----------

homogen verteilt. Diese Reaktionsmasse wird in 6 mm breiten Streifen mit einer Siebdruckmaschine (Gewebe : 190 μ) auf ein Glasfaserpapier (z.B. das Glasfaserfilter Nr. 85/90 von

130067/0393

05.08.80

3029579

- 14 -

Macherey, Nagel & Co.) in der im Beispiel 1 beschriebenen Form aufgebracht. Das bedruckte Glasfaserpapier wird bei 60°C - 80°C getrocknet und so in 12 mm breite Streifen geschnitten, daß die bedruckte Reaktionszone die eine Hälfte des Streifens ausmacht. Dieser Streifen wird auf das Ende einer Polyesterfolie geklebt ^{diese quer zu den Glasfaserpapieren} und in 6 mm breite Streifen geschnitten. Wenn nun auf die der Reagenzschicht abgewendeten Kante des unbeschichteten Glasfaserpapiers 40 μl Blut aufgetropft werden, diffundiert das Plasma unter die Reaktionszone. Diese nimmt in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration des Blutes eine unterschiedlich stark gefärbte blaue Reaktionsfarbe an. Die Intensität der Reaktionsfarbe entspricht derjenigen, die man erhält, wenn man anstelle des Blutes mit dem aus dem gleichen Blut gewonnenen Serum oder Plasma tüpfelt.

Beispiel 3

Eine Reagenzienmasse, bestehend aus

16,0 g	Cellulose M+N Ac 10
86,0 g	einer 0,2 %igen Lösung von Methylhydroxypropylcellulose (Culminal MHCP 8000)
0,32 g	Netzmittel (Marlon)
0,68 g	Netzmittel (Na-Dioctylsulfosuccinat)
12,0 g	Polyvinylpropionat-Dispersion (Propiofan 70 D)
0,48 g	Tetramethylbenzidin
10,0 g	Titandioxid
9600 U	Cholesterinesterase
7200 U	Cholesterinoxidase
$1,04 \times 10^4$ U	Peroxidase
0,01 g	Gallussäure

130067/0393

wird in einer Dicke von 0,2 mm auf ein hydrophobes Polyestervlies (Reemay 2033 von Du Pont) beschichtet und bei 60° C getrocknet. Anschließend werden ein 6 mm breiter Streifen dieser Beschichtung und ein 12 mm breiter Streifen eines Glasfaserfilters (z.B. das Filter 3362 von Schleicher & Schüll) so nebeneinander auf einen festen Plastikstreifen geklebt, daß das Glasfaserfilter sehr eng an das beschichtete Vlies anstößt. Wenn von diesem Plastikstreifen quer 6 mm breite Streifen abgeschnitten werden, dann erhält man Teststreifen, bei denen nach Auftropfen von ca. 50 µl Vollblut auf die vom Reagenzienvlies entfernte Seite des Glasfaserfilters nach kurzer Zeit nur reines Plasma in das Reagenzienvlies übertritt und zu einer blauen Reaktionsfarbe führt, deren Intensität mit der Konzentration des Cholesterins im Blut zunimmt.

Beispiel 4

Separate Plasmagewinnung

Ein sich nach unten konisch verjüngendes Kunststoffgefäß (z.B. die Kunststoffspitze einer Kolbenhubpipette)

wird zu 2/3 mit Glasfasern (z.B. die Faser 108 A aus Borosilikatglas der Firma Johns-Manville, Durchmesser: 0,5 - 0,8 µ) locker gefüllt. Nachdem der obere freie Teil mit Blut gefüllt wurde, diffundiert das Serum in die Gefäßspitze. Von dort kann eine "end-to-end"-Kapillare mit 15 µl Inhalt durch Heranführen an die Pipettenspitzenöffnung gefüllt werden. Das auf diese Weise gewonnene Plasma kann nun direkt jedem beliebigen analytischen Verfahren zugeführt werden.

Tabelle 1

Untersuchung des Trennvermögens verschiedener Glasfasern in einem Versuchsaufbau nach Beispiel 4
Glasfasern: Eigenschaften, Trennvermögen Erythrozyten/Plasma

Johns-Manville USA	VEB Trisola DDR	Durchmesser (µm) Bereich	Mittelwert	Faserlänge µm	Oberfläche m ² /g	Trennung Erythrozyten/Plasma
100		0,2 - 0,29	0,25	300	5,1	+
102		0,3 - 0,33	0,32		4,5	+
104		0,34 - 0,48	0,4	800	3,12	+
106		0,49 - 0,58	0,54	1000	2,6	+++
	U 60	0,51 - 0,64	0,58		-	++
108 A		0,59 - 0,88	0,74	1200	1,72	++
	U 70	0,65 - 0,76	0,71			++
	U 80	0,77 - 0,93	0,85			+++
	U 90	0,94 - 1,19	1,07			++
	U 100	1,2 - 1,44	1,32			+++
108 B		0,89 - 2,16	1,53		0,71	+++
	U 156	1,45 - 2,49	1,97		-	+
110		2,17 - 3,10	2,6		0,49	-
112		2,6 - 3,8	3,2	1900	0,40	-
	F	2,5 - 4,0	3,3			-

+ befriedigend ++ gut +++ sehr gut - negativ

130067/0393

3029579

03 08 80

0500

3029579

Number:
Int. Cl.3:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

3029579
A61 K 35/14
5. August 1980
18. Februar 1982

Fig. 1

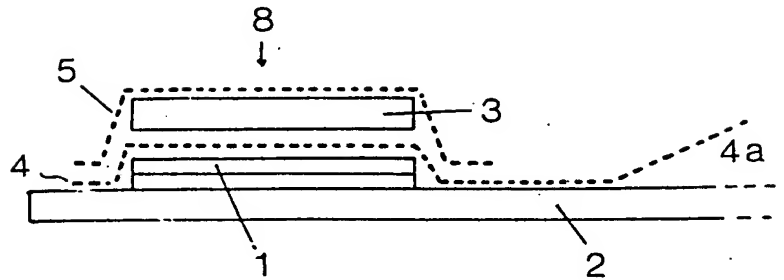


Fig. 2a

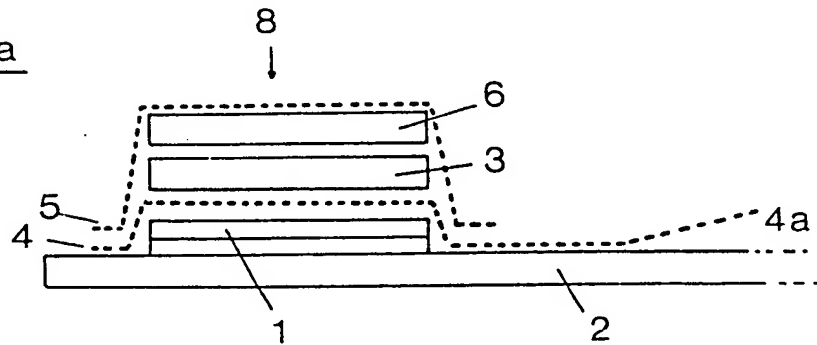
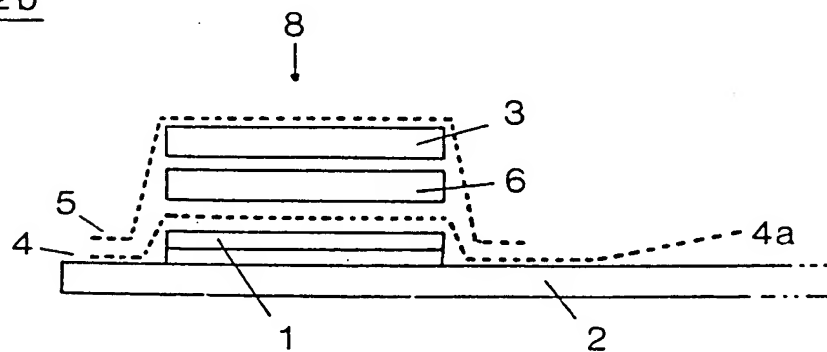


Fig. 2b



130067/0393

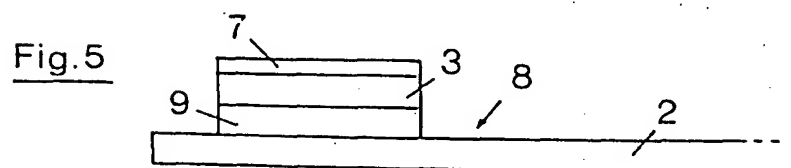
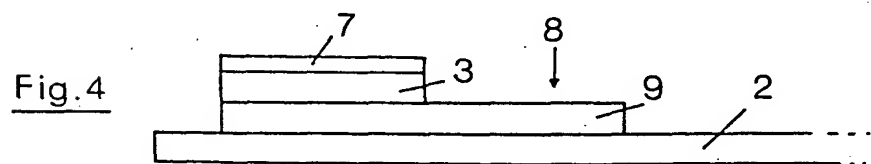
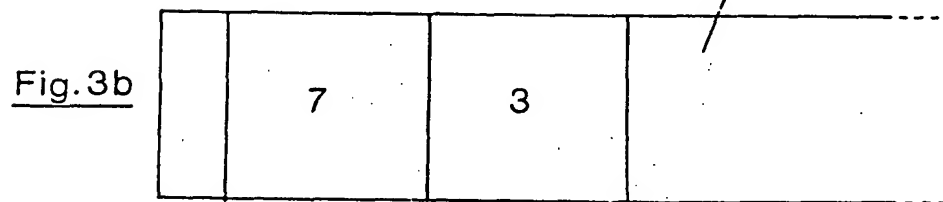
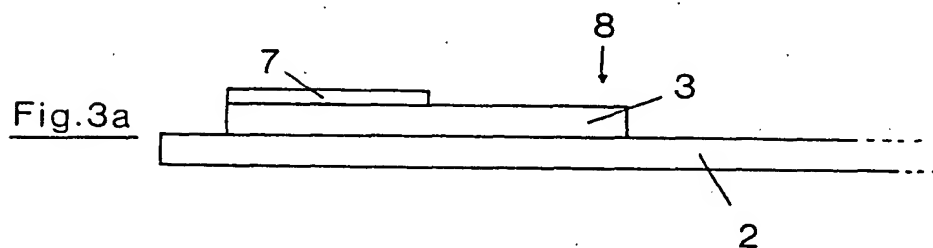


Fig.6

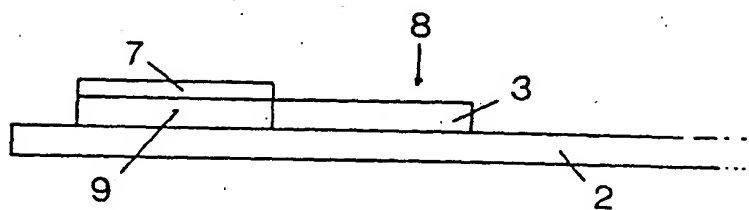


Fig.7

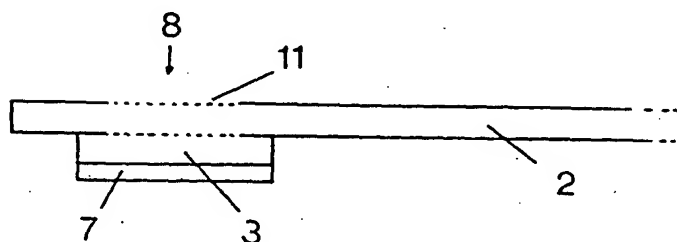


Fig.8a

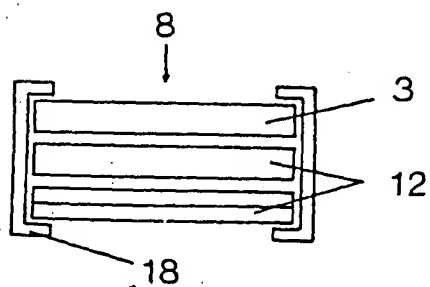


Fig.8b

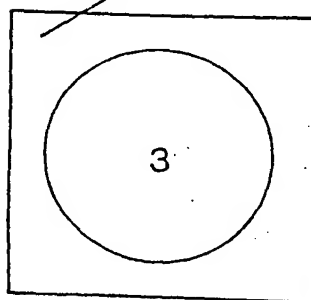
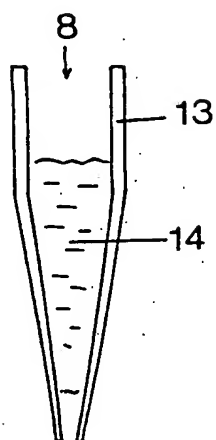
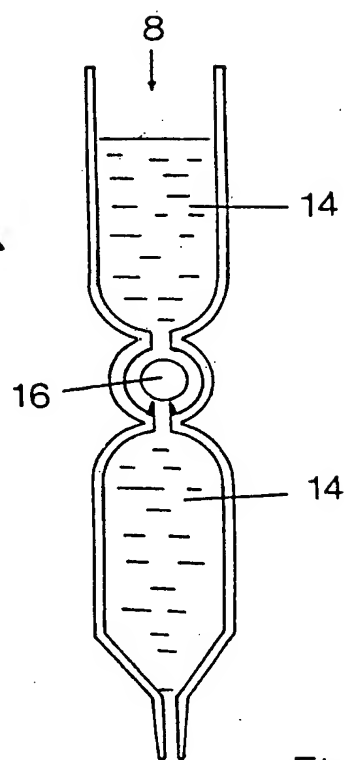
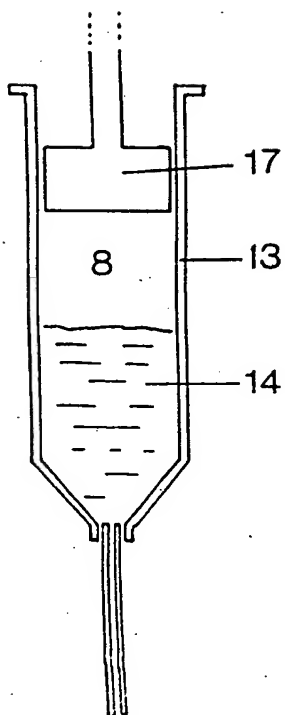


Fig. 9Fig. 10Fig. 11